

MINISSATÉLITES: NOVAS FERRAMENTAS MOLECULARES PARA O MAMOEIRO

Juliana Leles Costa¹; Eder Jorge de Oliveira²; Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹; Aline dos Santos Silva³; Michel E. Beleza Yamagishi⁴

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: julianaleles_17@hotmail.com; gfachardo@yahoo.com.br; ²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua da Embrapa, s/n, Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; ³Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, UFRB, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: lineagro@yahoo.com.br; ⁴Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, Av. André Tosello, 209, CEP 13083-886, Campinas, SP e-mail: michel@cnptia.embrapa.br.

Introdução

Os minissatélites são seqüências de 6 a 100 nucleotídeos repetidos e enfileirados de DNA (Jeffreys et al., 1985). Originalmente, esta metodologia utiliza os mesmos princípios da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que abrange técnicas de restrição do DNA e uso de sondas para hibridização, sendo extremamente laboriosa. Contudo, esses marcadores podem ser analisados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), de forma mais rápida e prática, uma vez que, as repetições são conservadas no genoma de uma mesma espécie. Sendo assim, é possível analisar as seqüências de DNA depositadas no banco de dados para o desenho de um grande número de locos de minissatélites para a cultura do mamoeiro, a exemplo de microssatélites (Oliveira et al., 2008).

Marcadores com locos específicos podem gerar altos níveis de polimorfismo, além de serem, codominantes e multialélicos com ampla aplicabilidade em estudos de diversidade genética, análises filogenéticas e *fingerprinting* de variedades (Oliveira et al., 2008). Nesse sentido, os marcadores minissatélites poderão auxiliar nas respostas aos programas de melhoramento, aos principais problemas agrônômicos da cultura e na implementação da seleção assistida. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a identificação e o desenvolvimento de minissatélites para a cultura do mamoeiro por meio de mineração na base de dados de DNA (Genbank/NCBI).

Material e Métodos

Foi realizada mineração no Genbank/NCBI por sequências de DNA da espécie *Carica papaya* L. As sequências de nucleotídeos foram obtidas no formato FASTA e avaliadas para a presença de minissatélites, visando repetições acima de sete nucleotídeos. Essas sequências foram analisadas no programa MISA (Thiel et al., 2003). A redundância das sequências foi verificada com o uso do programa Staden Package (<http://staden.sourceforge.net>). Sequências com similaridade acima de 90% foram consideradas redundantes e eliminadas das análises.

Os minissatélites foram classificados em perfeitos, composto-perfeito e interrompido, de acordo com a proposta de Weber (1990), com algumas modificações. Para o desenvolvimento dos iniciadores foi utilizado o software *Primer 3* (Rozen et al., 2000).

Para otimização das condições de reação e amplificação dos locos de minissatélites, utilizaram-se dois genótipos de mamoeiro (Calimosa e Sunrise Solo) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). As condições de reação foram: 10,0 ng de DNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 0,2 mM dos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs e 0,5 U de Taq DNA Polimerase com volume total de 15 µL.

As amplificações foram feitas em termociclador PTC-100 (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 4 min; 30 ciclos a 94 °C por 50s, (temperatura de anelamento variando de 58 a 63 °C de acordo com o iniciador – Tabela 1) por 50s, 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 48723 sequências relacionadas à pesquisa “*Carica papaya*” no NCBI em outubro de 2009. Deste total, foram encontrados 123 sequências contendo minissatélites, das quais, foi possível desenhar 49 *primers* minissatélites, com repetições de 7 a 18 nucleotídeos. Quarenta e cinco sequências (91,8%) são perfeitas, duas (4,1%) compostas-perfeitas e duas (4,1%) interrompidas. Dentre esses locos, 20 foram sintetizados, com variação no tamanho esperado de alelos de 284 a 979 pares de bases.

As concentrações dos reagentes para a PCR propiciaram adequada amplificação do DNA alvo (Figura 1). Doze iniciadores (60%) foram otimizados com a temperatura de anelamento de 60°C, os outros otimizaram à 58°C (10 %), 61°C (10%), 62°C (10%) e 63°C (10%) (Tabela 1). A análise preliminar com apenas dois genótipos indica que 14 marcadores (70%) são monomórficos e os outros seis (30%) são polimórficos. Entretanto, a próxima etapa do trabalho será a avaliação do polimorfismo dos 20 locos num conjunto de

germoplasma do BAG-Mamão da Embrapa-CNPMP. Os locos mais polimórficos serão extremamente úteis nos estudos de diversidade molecular, seleção assistida, construção de mapas genéticos, filogenia, dentre outros.

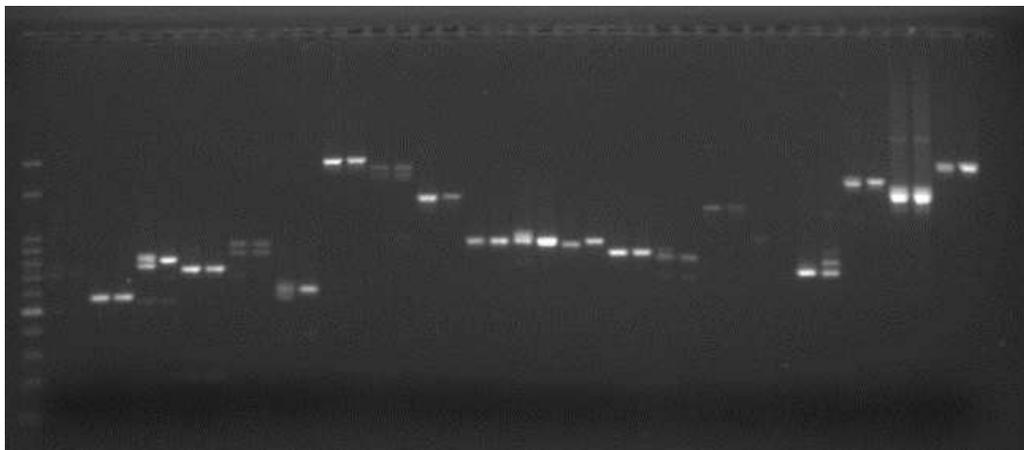


Figura 1: Padrão de amplificação em dois genótipos de mamoeiro (Calimosa e Sunrise Solo), com o uso de iniciadores de minissatélites. Amostra 1) Ladder 50 pb, 2 a 41) Primers de minissatélites em ordem crescente (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de iniciadores e características dos minissatélites otimizados com dois genótipos de mamoeiro.

Locos	Motivo do Minissatélite	Tipo	Tamanho do alelo esperado (pb)	Ta* ideal
CPMini-01	(TAGGGT)11	Perfeito	395	60
CPMini-02	(CTTCACCTT)6(CTTCATCTT)3 (AGAAAGAG)5agaag(AGAAAA AA)4	Perfeito-composto	691	63
CPMini-03	(AAACAGAGGTC)8	Interrompido	643	58
CPMini-04	(TTTTAAT)3 + (AATAAAAT)5	Perfeito	353	60
CPMini-05	(CCTTAAG)7	Interrompido	459	60
CPMini-07	(CTTGAAT)7	Perfeito	947	63
CPMini-08	(ATCACTT)5(ATCACTTGTCAT TT)2	Perfeito	284	58
CPMini-09	(TTAGGGT)6	Perfeito-composto	296	60
CPMini-10	(ATAAAAAA)6	Perfeito	979	60
CPMini-11	(ATTAATT)6	Perfeito	390	62
CPMini-12	(CCTTTCC)6	Perfeito	914	60
CPMini-13	(AGCCTGC)6	Perfeito	808	62
CPMini-14	(TTTTTTA)6	Perfeito	695	60
CPMini-15	(GAAAGAA)6	Perfeito	475	60
CPMini-16	(TAGTAAA)6	Perfeito	488	60
CPMini-18	(ATGAGCT)6	Perfeito	631	61
CPMini-19	(CTTCTTC)6	Perfeito	466	60
CPMini-20	(TATGAAATGTCACGCATT)6	Perfeito	479	61
CPMini-21	(TTGGAAT)6	Perfeito	423	60
CPMini-22		Perfeito	404	60

*Temperatura de anelamento do iniciador.

A grande vantagem no uso deste tipo de marcador reside no fato de que os fragmentos gerados pela PCR podem ser visualizados em géis de agarose 1000, reduzindo o tempo e o custo na execução do trabalho, tendo em vista a sua maior praticidade em relação aos procedimentos de análise em géis de poliacrilamida, ou mesmo pelo uso de sondas e Southern Blot. 60s; e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%.

Conclusão

Vinte locos de minissatélites foram desenvolvidos e otimizados para a cultura do mamoeiro. Este tipo de marcador trará grandes contribuições para a detecção de polimorfismos de forma rápida e prática na cultura do mamoeiro.

Agradecimentos

Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb).

Referências Bibliográficas

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable "Minissatélite" regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73. 1985.

OLIVEIRA, E.J.; DANTAS, J.L.L.; CASTELLEN, M.S.; MACHADO, M.D. Identificação de microsatélites para o mamoeiro por meio da exploração do banco de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 841-845. 2008.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. (2000). In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386.

THIEL T.; MICHALEK, V.; GRANER, A. Exploiting EST data-bases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 411–422. 2003.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, n.4, p.524-530. 1990.